इकाई 12

हार्मोन आमापन की विधियाँ

इकाई की रूपरेखा

12.1 प्रस्तावना

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

12.2 प्रतिरक्षा आमापन

प्रतिजन–प्रतिरक्षी आबंधन

12.3 इम्युनोएसे के प्रकार

12.4 रेडियोइम्यून परीक्षण

12.5 एन्जाइम लिन्कड इम्यूनोसोरबेंट एसे (ELISA)

12.6 सारांश

12.7 पाठांत प्रश्न

12.8 उत्तर

12.1 प्रस्तावना

पिछली इकाई में, आपने हार्मोन मध्यस्थ संकेतन का अध्ययन किया और सीखा कि कैसे ग्राहियों के माध्यम से हार्मोन अणु किसी लक्ष्य में प्रतिक्रिया को प्रेरित करते हैं। अब इस इकाई में आप शरीर के तरल पदार्थों में मौजूद हार्मोन को मापने की विभिन्न विधियों का अध्ययन करेंगे।

अंतःस्त्राव विज्ञान (एंडोक्रिनोलॉजी) कार्य करने के लिए एक आकर्षक क्षेत्र है, और जैविक नैदानिक जांच में हार्मोन या हार्मोन परख का माप एक महत्त्वपूर्ण तत्व है। उपापचय प्रक्रियाओं के विश्लेषण और नैदानिक स्थितियों की एक विस्तृत श्रृंखला के साथ–साथ उपचार की प्रभावकारिता की निगरानी के लिए हार्मोन आमापन महत्त्वपूर्ण है। इसके अलावा, यह मनुष्यों और जानवरों दोनों में विभिन्न शारीरिक उत्तेजनाओं, जैसे गर्मी, ठंड और विषाक्त पदार्थों के लिए शरीर की प्रतिक्रिया में एक अंतर्दृष्टि प्रदान करता है।

जनद (गोनाडल; gonadal) हार्मोन सहित विभिन्न हार्मोन के साथ–साथ अन्य ग्रंथियों जैसे कि पैराथायरायड और अधिवृक्क ग्रंथियों द्वारा स्त्रावित कई अन्य को रक्त में परख लिया जा सकता है।

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

इस इकाई का अध्ययन करने के बाद, आप इस योग्य हो जाएंगे कि :

- ❖ हार्मोन आमापन की व्याख्या करें;
- ❖ एंटीजन–एंटीबॉडी बंधन की व्याख्या करें; और
- ❖ हार्मोन विश्लेषण के लिए उपयोग की जाने वाली विभिन्न तकनीकों की व्याख्या करें।

12.2 प्रतिरक्षा आमापन

परिसंचारी रक्त में अधिकांश हार्मोन बहुत कम सांद्रता में मौजूद होते हैं। इस प्रकार हार्मोनी आमापन को स्पष्ट रूप से रक्त परीक्षण के रूप में माना जा सकता है, जिसमें विशिष्ट हार्मोन या संबंधित हार्मोन के सेट को मापने के लिए कुछ मिलीमीटर रक्त की आवश्यकता होती है। रक्त में बेहद कम मात्रा के कारण, हार्मोन को मापने से सम्बंधित सबूत प्रारंभिक एंडोक्रिनोलॉजी में कठिनाई से मिलता है। हालांकि, 20वी सदी के मध्य में, रेडियोइम्यूनोसे नामक, एक क्रांतिकारी तकनीक विकसित की गई,; जिसने हार्मोन और उनके अंतिम उत्पादों के मापन को संभव बनाया। इसके अलावा, अनेक विकासशील और संवेदनशील विधियों ने हार्मोन आमापन की सटीकता, विशिष्टता, सटीकता और सुग्रहिता को और बढ़ाया हैं।

"इम्यूनो" एक प्रतिरक्षा प्रतिक्रिया को संदर्भित करता है जो शरीर द्वारा एंटीबॉडी का उत्पादन करने का कारण बनता है। आमापन ("परख") एक परीक्षण को संदर्भित करता है। इस प्रकार, एक इम्युनोएसे एक परीक्षण है जो एंटीबॉडी और एंटीजन को एक साथ लाए जाने पर प्रतिरक्षीसंकुलन (इम्युनोकोम्पलेक्सिंग) का उपयोग करता है।

प्रतिरक्षा आमापन तकनीक

प्रतिरक्षा परीक्षण (Immunoassay इम्यूनोअसे) का उपयोग तब किया जाता है जब किसी नमूने के भीतर किसी विश्लेष्य (analyte; एनालाइट) की अज्ञात सांद्रता को निर्धारित करने की आवश्यकता होती है। यह एक ऐसा परीक्षण है जो एक मापने योग्य परिणाम उत्पन्न करने के साधन के रूप में प्रतिरक्षी (antibody; एंटीबॉडी) और प्रतिजन (antigen; एंटीजन) कॉम्प्लेक्स का उपयोग करता है। प्रतिजन और प्रतिरक्षी के बीच अत्यधिक विशिष्ट बंधन ही, विश्लेष्यों का पता लगाने की अनुमति देता है और यह सभी इम्बुएसेज की प्राथमिक परख विशेषता होती है।

प्रथम इम्युनोएसे का वर्णन क्रमशः इंसुलिन (1959) और थायरोक्सिन की मापन के लिए येलो एंड बर्सन और एकिन्स द्वारा किया गया था।

प्रतिरक्षी (एंटीबॉडी) की आबंधक (बाध्यकारी) स्थल एंटीजन सतह पर एक एपिटोप (इम्यूनो–निर्धारक क्षेत्र) को पहचानती है और फलस्वरूप एक इम्युनोएसे की संवेदनशीलता और विशिष्टता (प्रतिरक्षी) के प्रकार और प्रतिजन (एंटीजन) के लिए इसकी बंधुता और उग्रता (avidity) द्वारा निर्धारित की जाती है। इसके अतिरिक्त, आमापन प्रारूप के आधार पर, इम्युनोएसे को गुणात्मक या मात्रात्मक के रूप से वर्गीकृत किया जा सकता है।

एक एंटीबॉडी- एंटीजन संकुल को इम्यूनो–कॉम्प्लेक्स के रूप में भी जाना जाता है।

इम्युनोएसे विशिष्ट बीमारियों, रोग बायोमार्कर, हार्मोन और औषधियों (फार्मास्यूटिकल्स) से जुड़े प्रतिरक्षी के निम्न स्तर का तेजी से पता लगाने में मदद करते हैं। इम्यूनो सेज़ को अन्य प्रयोगशाला परीक्षणों से अलग माना जाता है क्योंकि वे एक मापने योग्य संकेत उत्पन्न करने के लिए एंटीबॉडी : एंटीजन कॉम्प्लेक्स का उपयोग करते हैं। इस तरह के विश्लेषणों में मात्रा निर्धारित इम्यूनोसे विशिष्ट बीमारियों, रोग जैवचिन्हकों (बायोमार्कर), हार्मोन और फार्मास्यूटिकल्स से जुड़े एंटीबॉडी के निम्न स्तर का तेजी से पता लगाने में

मदद करते हैं। इम्यूनोसेज़ को अन्य प्रयोगशाला परीक्षणों से अलग माना जाता है क्योंकि वे एक मापने योग्य संकेत उत्पन्न करने के लिए एंटीबॉडी–एंटीजन कॉम्प्लेक्स का उपयोग करते हैं। इस तरह के विश्लेषणों में मात्रा निर्धारित किए जाने वाले विश्लेष्य शरीर में स्वाभाविक रूप से मौजूद अणु (जैसे हार्मोन) या शरीर द्वारा उत्पादित अणु हो सकते हैं जो कि सामान्य रूप से मौजूद नहीं होते हैं (जैसे कैंसर एंटीजन) या अणु जो शरीर में स्वाभाविक रूप से मौजूद नहीं होते हैं (जैसे कि दुरूपयोगित दवा)।

विश्लेष्य (analyte) : एक प्रयोगशाला परीक्षण द्वारा मापा गया।

12.2.1 प्रतिजन प्रतिरक्षी आबंधन

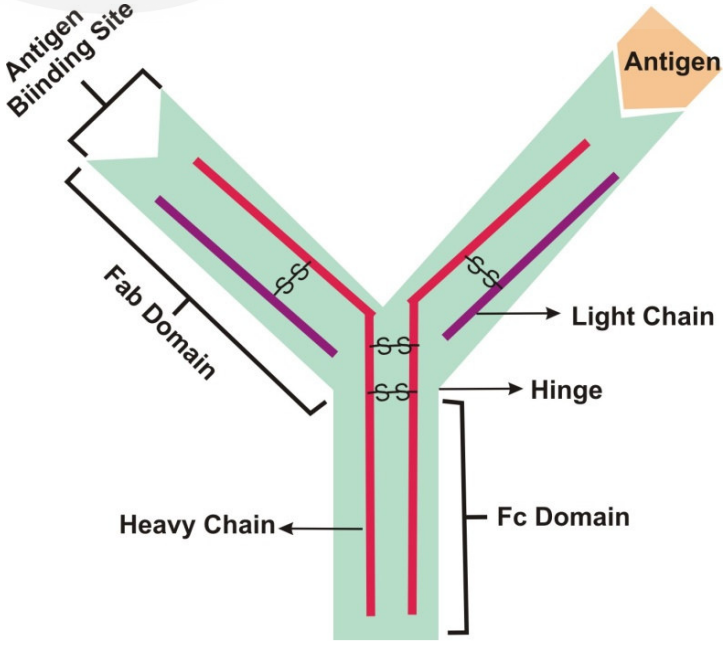
सभी इम्यूनोएसे विधियाँ एक प्रतिजन और एक प्रतिरक्षी के बीच अत्यधिक विशिष्ट और संवेदनशील अभिक्रिया पर आधारित होती हैं। संरचनात्मक रूप से, एंटीबॉडी वाई (Y)–आकार के अणु होते हैं, जिनमें चार पॉलीपेप्टाइड होते हैं। इनमें से दो इकाइयाँ समान होती हैं और भारी श्रृंखला कहलाती हैं और अन्य दो को हल्की श्रृंखला (चित्र 12.1) के रूप में जाना जाता है। प्लाज्मा कोशिकाओं द्वारा उत्पादित असंख्य एंटीबॉडी को आइसोटाइप द्वारा वर्गीकृत किया जाता है; जिनमें से प्रत्येक मुख्य रूप से संरचना परिवर्तनशीलता के कारण कार्य और प्रतिजन प्रतिक्रियाओं में भिन्न होता है। अपरास्तनियों (placental mammals) में पांच प्रमुख इम्युनोग्लोबुलिन की पहचान की गई है : आईजीजी (IgG), आईजीएम (IgM), आईजीए (IgA), आईजीई (IgE), और आईजीडी (IgD)। यह पहचान वाई–जैसी इकाइयों की संख्या और उनमें उपस्थित भारी–श्रृंखला पॉलीपेप्टाइड (γ, μ, α, ε और δ) के स्थिर क्षेत्र (constant region, Fc) में अमीनों अम्लों के अनुक्रम में अंतर के आधार पर की गई है।

एंटीजन एक ऐसा पदार्थ है जिसे शरीर एक प्रतिरक्षा प्रतिक्रिया को बढ़ाकर और एंटीबॉडी के उत्पादन को प्रेरित करके "लड़ने" (उन्मूलन या कम) करने की कोशिश कर रहा है।

एंटीबॉडी/ प्रतिरक्षी एक प्रोटीन है जो शरीर द्वारा "आक्रमणकारी" (विदेशी) पदार्थ / प्रतिजन के जवाब में निर्मित होता है। एंटीबॉडी, जिन्हें इम्युनोग्लोबुलिन के रूप में भी जाना जाता है, प्लाज्मा कोशिकाओं (WBC) द्वारा निर्मित ग्लाइकोप्रोटीन अणु हैं।

भारी श्रृंखला के अमीनो अम्ल अनुक्रमों में मामूली अंतरों के आधार पर IgG और IgA को आगे उपवर्गों में वर्गीकृत किया गया है (उदाहरण के लिए, मानवों में IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 और IgA2)। IgG, जिसे सबसे प्रचुर मात्रा में सीरम एंटीबॉडी के रूप में जाना जाता है, में तीन प्रोटीन डोमेन होते हैं, जिनमें से दो वाई की भुजाएं बनाते हैं और एक जैसे (Fab टुकड़े) होते हैं। प्रत्येक Fab क्षेत्र में एक एंटीजन के लिए एक बाध्यकारी साइट शामिल होती है। तीसरा डोमेन (पूरक–बाध्यकारी Fc टुकड़ा), जो प्रतिरक्षा प्रणाली के कार्य और विनियमन में आवश्यक है, वाई का आधार बनाता है।

एंटीजन बाइंडिंग साइटों को ले जाने वाले दो डोमन जिनमें प्रतिजन बंधन स्थल होते है, उन्हें Fab (F-fragment for a-antigen, b-binding) जाता है (एंटीजन बाइंडिंग साइट वाले टुकड़े के लिए नामित)।



चित्र 12.1 : एंटीबॉडी की संरचना।

प्रोटीन डोमेन जो प्रतिरक्षा नियमन में शामिल होता है, उसे Fc फ्रैगमेंट (F-Fragment; c-crystallizes- उस खंड के लिए जो क्रिस्टलीकृत होता है) कहा जाता है।

Fab और Fc टुकड़ों के बीच के क्षेत्र को हिंज कहा जाता है, जो दो एंटीजन बाइंडिंग डोमेन के पार्श्व और घूर्णन गति की अनुमति देता है।

प्रतिजन का वह क्षेत्र जो प्रतिरक्षी के साथ परस्पर क्रिया करता है, एपिटोप या प्रतिरक्षी निर्धारक क्षेत्र कहलाता है।

प्रतिरक्षी की प्रतिजन से बंधन उत्क्रमणीय, गैर सहसंयोजी परस्पर क्रियाओं पर आधारित होता है और प्रतिरक्षी के बंधनकारी क्षेत्र में 8–10 अमीनों अम्ल रह सकते हैं। प्रतिरक्षी–प्रतिजन परस्पर क्रिया की मजबूती प्रतिजन संरचना में थोड़े से परिवर्तन से भी प्रभावित हो सकती है। सामान्यतः उच्च बंधुता प्रतिरक्षियों को इम्यूनोएसे में वरीयता दी जाती है क्योंकि वे अधिक स्थिर संकुल बनाते हैं और निम्न बंधुता वाले प्रतिरक्षियों की अपेक्षा कम समय में अधिक प्रतिजनों से बद्ध होते हैं।

मूल इम्युनोएसे अभिक्रिया इस प्रकार है :

एंटीबॉडी (Ab) + एंटीजन (Ag) $\rightleftarrows$ एंटीबॉडी-एंटीजन (Ab-Ag)

बंधुता (affinity; एफिनिटी) प्रतिजन : प्रतिरक्षी बंधन की मजबूती का आमापन है और इसे सामान्यतः साम्यावस्था में प्रतिजन प्रतिरक्षी संकुल की मापित सांद्रता के रूप में व्यक्त किया जाता है। यह औसतन माइक्रो (10^{-6}) से पीको (10^{-12}) मोलर के बीच होती है।

एक इम्युनोएसे की प्राथमिक आवश्यकताएं इस प्रकार है :

- मात्रात्मक विश्लेष्य के लिए एक एंटीबॉडी।
- विश्लेष्य का एक लेबलीकृत रूप (इम्यूनोएसे के लेबल किए गए घटक को ट्रेसर के रूप में भी जाना जाता है)।
- या विश्लेष्य के लिए एक लेबलीकृत हुआ द्वितीय एंटीबॉडी।
- एंटीबॉडी–बाध्य ट्रेसर को अबाध ट्रेसर से अलग करने के लिए एक पृथक्करण प्रणाली।

एविडिटी एक अन्य पैरामीटर है जिसका उपयोग प्रतिजन : प्रतिरक्षी बाध्यकारी अभिक्रिया को चित्रित करने के लिए किया जाता है, और संकुल की कुल स्थिरता को निर्धारित करता है जो कि एपिटोप के लिए प्रतिरक्षी की बंधुता, प्रति प्रतिरक्षी अणु बाध्यकारी स्थलों की संख्या और इंटरेक्टिंग घटकों की ज्यामितीय व्यवस्था द्वारा अभिलक्षित होती है। एविडिटी बाध्यकारी अभिक्रिया में शामिल सभी कारकों का उच्चारण करता है, फलस्वरूप इम्युनोएसे की सफलता को निर्धरित करता है।

लेबल एक अणु है जो इम्युनोएसे के हिस्से के रूप में क्रिया करेगा, जिससे कि विलयन में संकेत में बदलाव को मापा जा सकता है। एक लेबल एक रेडियोधर्मी यौगिक है जो, एक एंजाइम द्वारा एक विलयन में रंग परिवर्तन का कारण बनता है, या एक पदार्थ हो सकता है जो प्रकाश को प्रतिदीप्त करता है।

इम्युनोएसे की असाधारण विशिष्टता, संवेदनशीलता और लचीलापन एंटीबॉडी के निम्नलिखित तीन महत्त्वपूर्ण गुणों के परिणाम हैं :

- प्राकृतिक और मानव निर्मित रसायनों, जैव–अणुओं, कोशिकाओं और वायरस की एक विस्तृत श्रंखला से जुड़ने की उनकी क्षमता।
- उस पदार्थ की अद्वितीय विशिष्टता जिससे प्रत्येक प्रतिरक्षी बंधता है।
- एक एंटीबॉडी और उसके लक्ष्य के बीच बंधन की ताकत।

बोध प्रश्न 1

क) सही कथन पर (√) सही का निशान लगाएँ :

i) एक एंटीबॉडी : एंटीजन कॉम्प्लेक्स को इम्यूनों–कॉम्प्लेक्स के रूप में भी जाना जाता है।

ii) एंटीजन संरचना में मामूली बदलाव से भी एंटीबॉडी–एंटीजन परस्पर क्रिया की ताकत प्रभावित हो सकती है।

iii) इम्यूनोएसे में लेबल, हमेशा एक रेडियोधर्मी यौगिक होता है, जो किसी घोल में रंग बदलने या प्रकाश को प्रतिदीप्त करने वाले पदार्थ का कारण बनता है।

iv) बंधुता, एंटीजन : एंटीबॉडी बंधन की ताकत का माप है।

ख) उचित शब्दों से रिक्त स्थानों की पूर्ति कीजिए :

i) एक इम्युनोएसे के लेबल किए गए घटक को ..... के रूप में भी जाना जाता है।

ii) प्रतिजन का वह क्षेत्र जो प्रतिरक्षी के साथ परस्पर क्रिया करता है, ... कहलाता है।

iii) ..... इम्युनोएसे में पसंद किया जाता है क्योंकि वे अधिक स्थिर संकुलों का निर्माण करते है और कम–बंधुता एंटीबॉडी की तुलना में कम अवधि में अधिक एंटीजन को बांध सकते हैं।

12.3 इम्यूनोएसे के प्रकार

लेबल के उपयोग से विश्लेष्य आमापन के आधार पर, इम्युनोएसे को मोटे तौर पर प्रतिस्पर्धी (competetive; कॉम्पीटीटिव) (non-competitive; नॉन कॉम्पीटीटिव) में बाँटा गया है।

प्रतिस्पर्धी विधि : प्रतिस्पर्धी इम्युनोएसे सामान्यतः छोटे अणुओं जैसे कि औवधी और स्टेरॉयड के लिए प्रयोग किया जाता है। प्रतिरस्पर्धी इम्युनोएसे रेडियोधर्मी लेबलीकृत प्रतिजन (Ag) की निश्चित मात्रा और नमूने में एक प्रतिरक्षी पर बाध्यकारी स्थलों की सीमित युक्त गैर लेबलीकृत (या ठंडा) प्रतिजन (Ag) की अज्ञात मात्रा के बीच प्रतिस्पर्धी अभिक्रिया पर आधारित है।

दूसरे शब्दों में, हम कह सकते हैं कि प्रतिस्पर्धी आमापनों में, परीक्षण नमूने में बिना लेबल वाले विश्लेष्य (आमतौर पर एंटीजन) को लेबल किए गए एंटीजन के साथ प्रतिस्पर्धा करने की क्षमता से मापा जाता है। लेबल रहित एंटीजन लेबल किए गए एंटीजन की बाध्यकारी क्षमता को अवरूद्ध करता है क्योंकि एंटीबॉडी पर बाध्यकारी साटइ पहले से ही व्याप्त है। नतीजतन, एक प्रतिस्पर्धी इम्युनोएसे में, कम लेबल वाले एंटीजन को मापा जा रहा है जिसका मतलब है कि बिना लेबल वाले (परीक्षण नमूना) एंटीजन का अधिक हिस्सा मौजूद है। इम्यूनोएसे के प्रतिस्पर्धी प्रारूप में, परीक्षण नमूने में एंटीजन की मात्रा मापी गई लेबल की मात्रा से विपरीत रूप से संबंधित होती है।

गैर–प्रतिस्पर्धी (सैंडविच) विधि

गैर–प्रतिस्पर्धी आमापन मुख्य रूप से उच्चतम विशिष्टता और संवेदनशीलता प्रदान करता है और ह्रदय संबधी (कार्डियक) और हेपेटाइटिस चिन्हकों जैसे महत्त्वपूर्ण विश्लेष्यों को मापने के लिए फायदेमंद है। इस आमापन को "सैंडविच" आमापन के रूप में भी जाना जाता है क्योंकि विश्लेष्य दो अत्यधिक विशिष्ट एंटीबॉडी अभिकर्मकों के बीच बंधा हुआ (सैंडविच) है।

इस पद्धति में, लेबल किए गए विश्लेष्य (आमतौर पर एंटीबॉडी) का मापन, नमूने में मौजूद एंटीजन की मात्रा के सीधे आनुपातिक होता है। इस प्रकार, परीक्षण विलयन में जितने अधिक एंटीजन मौजूद होंगे, उतने ही अधिक लेबल वाले एंटीबॉडी बाध्य होंगे।

पहचान के तरीके, विश्लेष्य से जुड़े लेबल और प्रतिरक्षी के आधार पर, इम्युनोएसे को निम्नानुसार वर्गीकृत किया जा सकता है :

- **रेडियोइम्यूनोएसे या इम्यूनोरेडियोमेट्रिक आमापन –** विश्लेष्यों और एंटीबॉडी से जुड़े लेबल रेडियोधर्मी होते हैं (जैसे, आयोडीन–125)।

- **एंजाइम इम्यूनोएसे या इम्यूनोमेट्रिक आमापन, या एंजाइम से जुड़े इम्युनोसॉरबेंट आमापन** [**एलिसा; ELISA-** enzyme linked immunosorbent assay] **–** विश्लेष्यों और एंटीबॉडी से जुड़े लेबल एल्कलाइन फॉस्फेटेज (alkaline phosphatase) और हॉर्स रैडिश परऑक्सीडेज (horse raddish peroxidase) जैसे एंजाइम होते हैं।

- **फ्लोरोइम्यूनोएसे** : विश्लेष्यों से जुड़े लेबल फ्लोरोसेंट प्रोब (जैसे, फ्लोरेसिन) हैं, जो फ्लोरोसेंट सिग्नल का उत्सर्जन करते हैं।

- **केमिलुमिनेसेंस इम्यूनोएसे** : लेबल (जैसे, एक्रिडिनियम एस्टर) एक सब्सट्रेट को एक अभिक्रिया उत्पाद में परिवर्तित करते है, जो एक रंग विकसित करने के बजाय प्रकाश के एक फोटॉन का उत्सर्जन करता है। यह तकनीक अति–संवेदनशील है और जैविक अणुओं की सूक्ष्म सांद्रता को पहचान सकती है।

सामान्य तौर पर, रक्त में हार्मोन सांद्रता को निम्नलिखित दो तरीकों से मापा जाता है :

12.4 रेडियोइम्यूनो परीक्षण

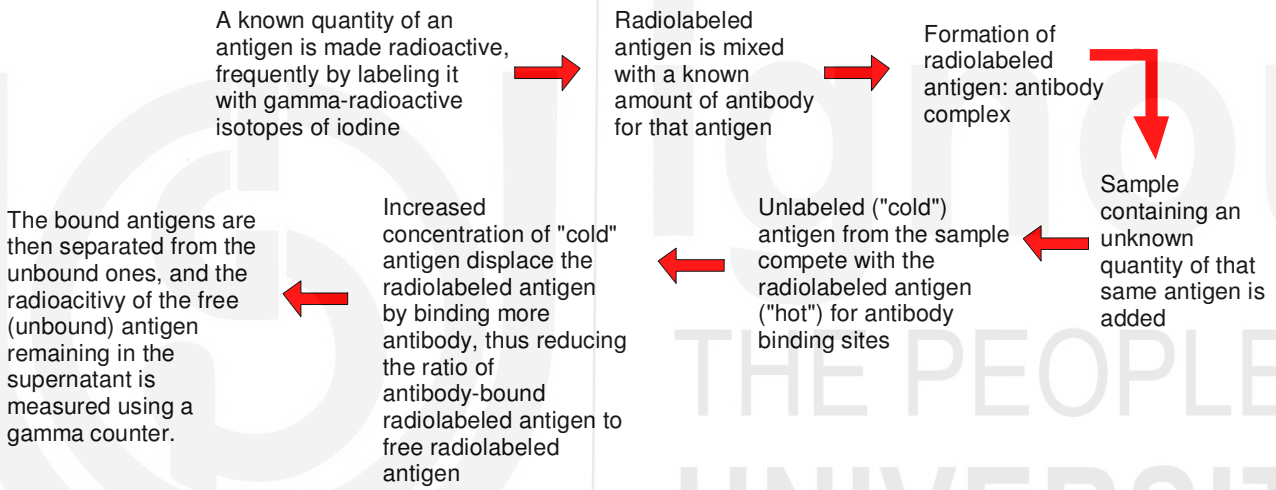
रेडियोइम्यून परीक्षण (RIA; Radio immuno assay) एक प्रतिस्पर्धी–बाध्यकारी आमापन का पारंपरिक मॉडल है। यह एक अत्यधिक संवेदनशील प्रयोगशाला तकनीक है जिसका उपयोग शरीर के तरल पदार्थो में मौजूद एंटीजन, हार्मोन और दवाओं जैसे पदार्थों की सांद्रता को मापने के लिए किया जाता है। यह विधि प्राणी विज्ञान (zoology; जूलॉजी) में परमाणु भौतिकी का एक अनुप्रयोग है, क्योंकि रेडियोधर्मी समस्थानिकों का उपयोग प्रतिरक्षात्मक क्रियाओं को मापने के लिए किया जाता है।

RIA तकनीकों की शुरूआत ने रक्त में विभिन्न हार्मोन के परिसंचारी स्तरों का पता लगाने की अनुमति दी है। इसमें एक रेडियोलेबलीकृत और गैर–लेबल हार्मोन का एक उच्च–बंधुता एंटीबॉडी के लिए प्रतिस्पर्धी बंधन शामिल है। लेबलीकृत हार्मोन एंटीबॉडी–बाध्यकारी साइटों के लिए लेबल रहित हार्मोन के साथ प्रतिस्पर्धा करते हैं। हार्मोन की ज्ञात मात्रा के साथ एक मानक वक्र (standard curve) का उपयोग नमूनों में हार्मोन की सांद्रता की गणना करने के लिए किया जाता है। नीचे दिए गए बिंदु RIA तकनीक को बेहद सटीक और अन्य प्रतिरक्षा परीक्षणों के प्रति संवेदनशील बनाते हैं।

- एक प्रतिरक्षा अभिक्रिया यानी प्रतिजन : प्रतिरक्षी बंधन।

- एक प्रतिस्पर्धी बाध्यकारी अभिक्रिया, जो विशिष्टता प्रदान करती है।
- रेडियोधर्मी टैग का उपयोग हार्मोन की कम सांद्रता का पता लगाने की अनुमति देता है।
- रेडियो उत्सर्जन का मापन, जो संवेदनशीलता प्रदान करता है। रेडियो लेबलीकृत एंटीजन से गामा किरणों को मापा जाता है।

वांछित प्रयोगात्मक लक्ष्य को प्राप्त करने के लिए, रेडियोइम्यूनोसे का उपयोग कई तरीकों से किया जा सकता है। हालांकि, सामान्य तौर पर, अभी भी उपयोग में आने वाले अधिकांश रेडियोइम्यूनोएसे एक ठोस–अवस्था वाले आधार के लिए एंटीबॉडी या एंटीजन के बंधन पर आधारित होते हैं, जैस कि माइक्रोटाइटर प्लेट के पॉलीस्टाइरिन या पॉलीविनाइलक्लोराइड कुएं। सबसे अधिक उपयोग किया जाने वाला रेडियोधर्मी लेबल I^{125} है, जो प्रोटीन की समग्र संरचना पर बिना किसी महत्त्वपूर्ण प्रभाव के, उस पर उजागर टायरोसिन अवशेषों के साथ बांधता है (चित्र 12.2)।



चित्र 12.2 : रेडियो इम्यून परीक्षण की विधि।

12.5 एन्जाइम लिन्कड इम्युनोसोरबेन्ट एसे (एलिसा; ELISA)

एलिसा (ELISA), जो एक प्लेट–आधारित आमापन तकनीक है, एक नमूने में विशिष्ट विश्लेषकों (जैसे पेप्टाइड्, प्रोटीन, एंटीबॉडी और हार्मोन) की मात्रा/सांद्रता का पता लगाने और इसकी मात्रा निर्धारित करने के लिए तैयार की गई है। ये आमापन सिद्धांत रूप से रेडियोइम्यूनोएसे के समान हैं, लेकिन रेडियोसमस्थानिक, के बजाय एंटीबॉडी या एंटीजन सहसंयोजी रूप से एंजाइमों से बंधे होते हैं। इसके अलावा, एलिसा में विश्लेष्यों के स्थिरीकरण की आवश्यकता होती है, परिणामस्वरूप, एंटीबॉडी या एंटीजन आमतौर पर एक पॉलीस्टाइरिन मल्टीवेल प्लेट जैसी एक ठोस सतह पर स्थिर होते हैं, और फिर संसूचक प्रणाली (डिटेक्टर सिस्टम; detector system) के साथ जुड़े होता है।

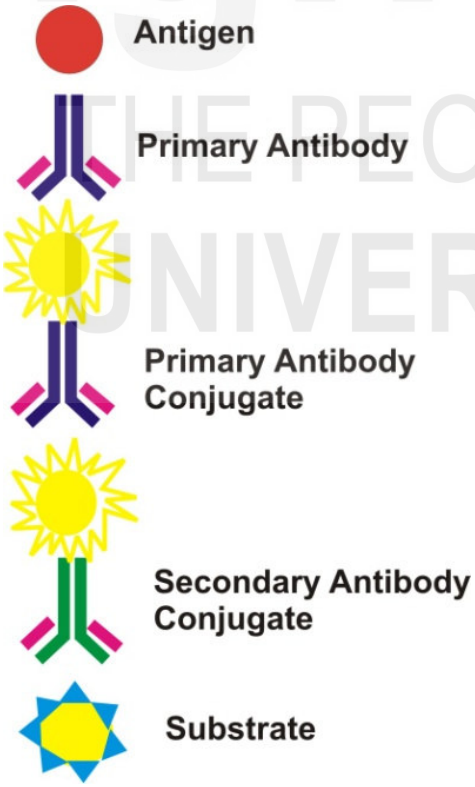
एलिसा में संसूचक प्रणाली आमतौर पर एक अभिकारक (एक Ab या विश्लेष्य) से जुड़ा एक एंजाइम (उदाहरण के लिए, हॉर्सरैडिश परॉक्सीडेज, एल्केलाइन फॉस्फेटेज) होता है।

एलिसा में उपयोग किए जाने वाले सामान्य वर्णोत्पादक (क्रोमोजेन; chromogen) में पैरा–नाइट्रोफिनाइल फॉस्फेट और 2, 2'–एज़िनो डाई – (3–एथिलबेन्ज़–थियाज़ोलिन सल्फ़ोनिक अम्ल, ओरथो–फिनाइलीनडायमीन, और टेट्रामेथिलबेन्ज़िडाइन) शामिल हैं। संयुग्मित एंजाइमों का चयन उनकी एक सब्सट्रेट के रंगीन, फ्लोरोसेंट, या केमिलुमिनसेंट उत्पाद में रूपांतरण को उत्प्रेरित करने की क्षमता के आधार पर किया जाता है।

एलिसा आमापन रेडियोइम्यूनोसे की सुग्रहिता से मेल खाती है और नमूनों में एंटीजन और यह नमूने में प्रतिजन या एंटीबॉडी के गैर–खतरनाक तरीके से पता लगाने का आसान, कम खर्चीला परिक्षण है।

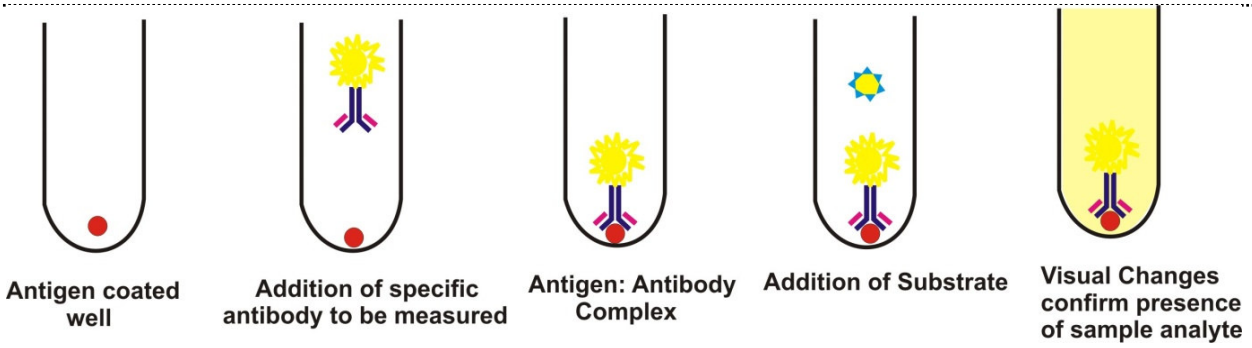
एंजाइम–लिंक्ड इम्युनोसॉरबेंट एसे (एलिसा) सबसे आम इम्युनोसे प्रकार हैं, और एलिसा आमापनों को सामान्य रूप से वर्गीकृत किया जा सकता है : (i) प्रत्यक्ष / परोक्ष एलिसा, (ii) अपरोक्ष एलिसा, और (iii) सैंडविच एलिसा।

प्रत्यक्ष एलिसा : मुख्य रूप से एक प्रत्यक्ष एलिसा परीक्षण में, एंटीजन को एक पॉलीस्टाइरिन प्लेट में सोख लिया जाता है, और फिर अन्य सभी बाध्यकारी साइटों को अवरूद्ध करने के लिए एक अन्य प्रोटीन (सामान्य रूप से गोजातीय सीरम एल्ब्यूमिन; bovine serum albumin) को अधिकता में डाला जाता है। एंजाइम के लिए संयुग्मित एंटीबॉडी को एंटीजन का पता लगाने के लिए प्रयोग किया जाता है।



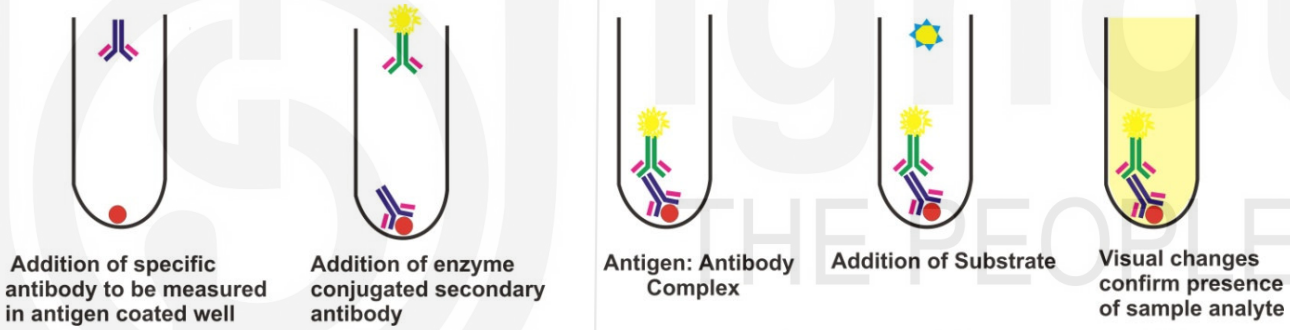
चित्र 12.3 : एलिसा आरेखों में प्रयुक्त संकेत।

अतिरिक्त एंजाइम–एंटीबॉडी कॉम्प्लेक्स को धोने के बाद, एन्जाइम के लिए उपयुक्त सब्सट्रेट डालने पर दिखाई देने वाले परिवर्तन होते हैं जो एंटीजन के संकेत को दर्शाता है (चित्र 12.3 और 12.4)।



चित्र 12.4 : प्रत्यक्ष एलिसा।

अप्रत्यक्ष एलिसा : अप्रत्यक्ष एलिसा में, सीरम या प्राथमिक एंटीबॉडी युक्त कोई अन्य नमूना माइक्रोटाईटर वेल से जुड़े एंटीजन के साथ अभिक्रिया करता है और एक प्राथमिक एंटीजन–एंटीबॉडी कॉम्प्लेक्स बनाता है, जिसे एंजाइम अणुओं द्वारा द्वितीयक (अभिज्ञान) एंटीबॉडी से संयुग्मित किया जाता है। एक उपयुक्त सब्सेट्रेट को जोड़ने के बाद, एंजाइम एक रंगीन अंत–उत्पाद के उत्पादन को उत्प्रेरित करता है, जिसे दृष्टिगत और परिमाणित किया जा सकता है (चित्र 12.5), अक्सर उपयोग किए जाने वाले एल्केलाइन फॉस्फेटेज (एपी) या हॉर्सरैडिश पेराक्सीडेज (एचआरपी) हैं
।

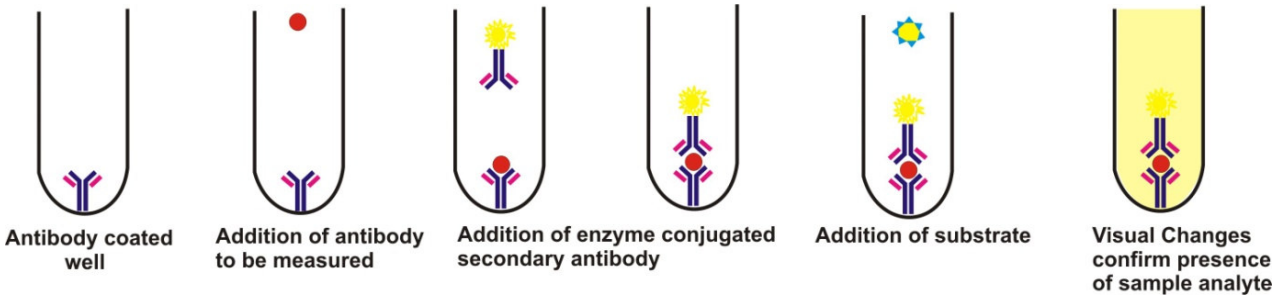


चित्र 12.5 : अप्रत्यक्ष एलिसा।

प्रत्यक्ष और अप्रत्यक्ष दोनों आमापन में प्रतिजन पॉलीस्टाइरीन वेल से प्रत्यक्ष रूप से बद्ध होता है और केवल उपयोग की गई अभिज्ञान प्रतिरक्षी में भिन्नता होती है। प्रत्यक्ष एलिसा में केवल एक एंडीबाडी प्रयोग की जाती है। यह एकल एंटीबॉडी अभिज्ञान एन्जाइम से सीधा युग्मित होती है। अप्रत्यक्ष एलिसा में दो एंटीबॉडी की आवश्यकता होती है : एक प्राथमिक एंटीबॉडी और एक एंजाइम से जुड़े द्वितीयक एंटीबॉडी जो प्राथमिक एंटीबॉडी के पूरक, होती है। प्रत्यक्ष एलिसा में सुग्राहिता कम होती है क्योंकि आमापन से उत्पन्न संकेत अप्रत्यक्ष एलिसा की तुलना में कम प्रवर्धित होता है; हालाँकि, उन्हें बहुत तेज़ी से निष्पादित किया जा सकता है क्योंकि पता लगाने के लिए केवल एक चरण की आवश्यकता होती है।

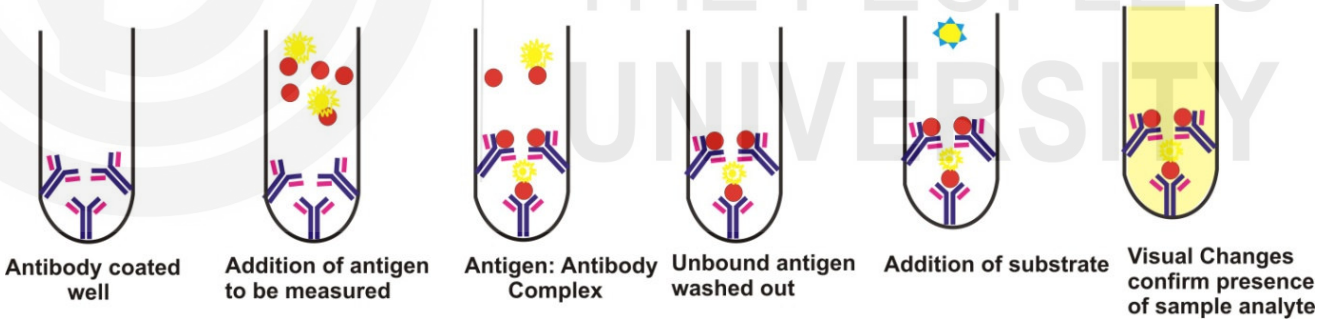
सैंडविच एलिसा : सैंडविच (capture; कैप्चर) एलिसा में, एंटीबॉडी (एंटीजन के बजाय) माइक्रोटाईटर कूप पर स्थिर होती है, और अज्ञात मात्रा में एंटीजन युक्त नमूना स्थिर एंटीबॉडी के साथ अभिक्रिया करता है। अपरिबद्ध (अनबाउंड) नमूने को धोकर हटा दिया जाता है, और एंटीजन पर एक अलग एपिटोप के लिए विशिष्ट एंजाइम– बाध्य द्वितीय एंटीबॉडी को जोड़ा जाता है, जो प्राथमिक एंटीबॉडी पर पहले से ही बाध्य एंटीजन के साथ क्रिया करता है। धोकर किसी भी मुक्त द्वितीय एंटीबॉडी को हटा दिए जाने के

बाद, एक उपयुक्त सब्सट्रेट जोड़ा जाता है, और रंगीन प्रतिक्रिया उत्पाद को मापा जाता है (चित्र 12.6)। उत्पादित रंग की मात्रा मूल नमूने में मौजूद एंटीजन की मात्रा के सीधे आनुपातिक होती है। यह आमापन व्यवस्था दो एंटीजन–विशिष्ट एंटीबॉडी का उपयोग करता है, इस प्रकार इसे सैंडविच आमापन कहा जाता है (चित्र 12.6)।



चित्र 12.6 : सैंडविच (कैप्चर) एलिसा।

प्रतिस्पर्धी एलिसा : इस पद्धति में, प्रतिस्पर्धी बंधन मूल प्रतिजन (नमूना प्रतिजन) और ऐड–इन प्रतिजन द्वारा पूरा किया जाता है। प्राथमिक एंटीबॉडी (बिना लेबल वाले) को प्रतिजन युक्त नमूने के साथ घोल में उष्मायित किया जाता है। इसके बाद, एंटीबॉडी–एंटीजन कॉम्प्लेक्स को 96–वेल प्लेट में डाला जाता है और इन वेल प्लेट को अधिमानतः एक ही एंटीजन के साथ पूर्व–लेपित किया जाता है। इसके बाद अपरिबद्ध एंटीबॉडी को हटाने के लिए प्लेट को धोया जाता है (चित्र 12.7)। नमूने में जितने अधिक लक्ष्य प्रतिजन मौजूद होंगे, पूर्व–लेपित कूप में प्रतिजन को बांधने के लिए कम मुक्त प्रतिरक्षी उपलब्ध होगा, इसलिए "प्रतियोगिता" शब्द उचित है। द्वितीयक एंटीबॉडी, जो प्राथमिक एंटीबॉडी के लिए विशिष्ट और एक एंजाइम के साथ संयुग्मित है, को डाला जाता है, जिसके बाद सब्सट्रेट डाला जाता है। शेष एंजाइम तब एक क्रोमोजेनिक या फ्लोरोसेंट संकेत उत्पन्न करते हैं (चित्र 12.7)।



चित्र 12.7 : प्रतिस्पर्धी एलिसा।

एलिसा को गुणात्मक या मात्रात्मक के रूप में उपयोग किया जाता सकता है। गुणात्मक परिणाम नमूने के लिए सकारात्मक या नकारात्मक परिणाम प्रदान करते हैं। हालांकि, मात्रात्मक परिणामों में, देखे गए रंगीन उत्पाद की मात्रा एंजाइम–बाध्य एंटीबॉडी की मात्रा के सीधे आनुपातिक होगी जो प्राथमिक एंटीबॉडी से बाध्य हैं और फिर एंटीजन से। एंटीबॉडी या एंटीजन की ज्ञात मात्रा वाले मानकों का उपयोग नमूने के भीतर एंटीजन/एंटीबॉडी की सांद्रता को निर्धारित करने के लिए किया जा सकता है। मानक विलयनों के श्रंखला बद्ध तनूकरण एवं अवशोषणांक मान का उपयोग करके एक मानक वक्र बनाया जाता है। इसके बाद, ऐसे आरेखों का उपयोग उनके अवशोषणांक मान पर विचार करके एंटीबॉडी/एंटीजन की सांद्रता को निर्धारित करने के लिए किया जाता सकता है।

12.6 सारांश

अब तक हमने जो पढ़ा है आइए संक्षेप में जानते है :

- एंटीबॉडी इम्युनोग्लोबुलिन होते हैं जिनमें संबंधित एंटीजन के लिए सटीक प्रतिक्रियाशील बाध्यकारी साइटें होती हैं।
- प्रतिजनों में विशिष्ट प्रतिरक्षी से बंधने के लिए निश्चित प्रतिक्रियाशील स्थल होते हैं जिन्हें एपिटोप या प्रतिजनी निर्धारक कहते हैं।
- एक प्रतिरक्षी एक प्रतिजन (विश्लेषक) से बंधता है और एक प्रतिरक्षी संकुल (एंटीबॉडी : प्रतिजन) बनाता है, जो प्रतिरक्षी परीक्षणों का आधार है।
- इम्यूनोएसे में एक प्रमुख कारक एक नमूना विलयन में लक्ष्य विश्लेष्य के लिए प्रतिरक्षी की प्रतिक्रिया होता है। इम्यूनोएसे की विशिष्टता मुख्यतः उपयोग की जाने वाली एंटीबॉडी की विशिष्टता द्वारा निर्धारित होती है।
- इम्यूनोएसे को अनेक लेबल की मदद से देखा जा सकता है जैसे एन्जाइम (उदाहरणतः एल्केलाइन फॉस्फेटेज और हार्स रेडिश परॉक्सीडेज) जो रंगीन अंतिम उत्पाद उत्पन्न करते है या रेडियोधर्मी लेबल जैसे कि I^{125} जो बेहतर सुग्राहिता और सटीकता देते हैं।
- साधारण इम्यून आमापन जैसे RIA या ELISA अंतस्त्रावी विज्ञान प्रयोगशाला में अपनी प्रबलता और उच्च सुग्राहिता के कारण प्रमुख भूमिका अदा करते हैं। इन्हें अभी तक जटिल तकनीकों द्वारा विस्थापित नहीं किया जा सका जिसका कारण है विभिन्न प्रतिरक्षियों द्वारा संभावित व्यवधान, जिससे विधि की सुग्राहिता और विशिष्टता कम हो सकती है।

12.7 पाठांत प्रश्न

1. प्रतिरक्षी और प्रतिजन को परिभाषित कीजिए।
2. रेडियोइम्यूनोएसे के सिद्धांत की व्याख्या करें?
3. प्रत्यक्ष एलिसा विधि अप्रत्यक्ष एलिसा से किस प्रकार भिन्न है?

12.8 उत्तर

बोध प्रश्न

1. क) i) सही
   ii) सही
   iii) गलत
   iv) सही

ख) i) अनुरेखक

ii) एपिटोप

iii) उच्च बंधुता एंटीबॉडी

पाठांत प्रश्न

1. एंटीजन एक पदार्थ है जिसे शरीर प्रतिरक्षा प्रतिक्रिया को बढ़ाकर और एंटीबॉडी के उत्पादन को प्रेरित करके उनसे लड़कर उन्हें समाप्त या कम करने की कोशिश कर रहा है। एंटीबॉडी एक प्रोटीन है जो शरीर द्वारा "आक्रमणकारी" (विदेशी) पदार्थ के जवाब में निर्मित होता है। एंटीबॉडी, जिन्हें इम्युनोग्लोबुलिन के रूप में भी जाना जाता है, प्लाज्मा कोशिकाओं (श्वेत रक्त कोशिकाओं) द्वारा निर्मित ग्लाइकोप्रोटीन अणु हैं।

2. रेडियोइम्यूनोएसे (आरआईए) का अर्थ है प्रतिजन–प्रतिरक्षी विशिष्ट बंध का प्रयोग कर एक मिश्रण से प्रोटीन का पृथक्करण और रेडियोधर्मिता द्वारा मात्रा नापना।

3. अप्रत्यक्ष और प्रत्यक्ष दोनों प्रकार के परीक्षणों में एंटीजन सीधे पॉलीस्टाइरिन वेल से बंधे होते हैं और केवल उपयोग किए जाने वाले अभिज्ञान एंटीबॉडी में भिन्न होते है। प्रत्यक्ष एलिसा में केवल एक एंटीबॉडी का उपयोग किया जाता है – यह एकल एंटीबॉडी सीधे डिटेक्शन एंजाइम में संयुग्मित होता है।

   अप्रत्यक्ष एलिसा को दो एंटीबॉडी की आवश्यकता होती है–एक प्राथमिक एंटीबॉडी और एक एंजाइम–लिंक्ड सेकेंडरी एंटीबॉडी जो प्राथमिक एंटीबॉडी का पूरक होता है। प्रत्यक्ष एलिसा को कम सुग्राहिता के लिए जाना जाता है क्योंकि अप्रत्यक्ष एलिसा की तुलना में परख से उत्पन्न संकेत कम प्रवर्धित होता है; हालाँकि, उन्हें बहुत तेज़ी से निष्पादित किया जा सकता है क्योंकि पता लगाने के लिए केवल एक चरण की आवश्यकता होती है।